

**Caracterización del agente causal de la pudrición de bulbo en violeta de los Alpes
(*Cyclamen persicum* Mill.), en viveros de San Antonio del Tequendama.**

**Characterization of causal agent bulb rot Alpine violet (*Cyclamen persicum* Mill.) In
nurseries San Antonio del Tequendama.**

DANIEL EDUARDO MOYA RUIZ; PAOLA MORENO LOPEZ.

RESUMEN

Las especies ornamentales son cada vez más una oportunidad para el crecimiento económico de las regiones, San Antonio del Tequendama se ha convertido en un icono de la producción ornamental el área cultivada con estas especies es cada vez mayor. La violeta de los alpes es una de esas especies que gana cada vez más espacio en el mercado, esta planta se cultiva bajo invernadero en materos de plástico de 14 centímetros de diámetro, se cultiva en sustratos especializados durante 48 semanas antes de ofrecerlos a la venta. Sin embargo esta planta presenta en cultivos de la finca los Alpes pudriciones de bulbo generando la marchitez de las plantas, estas pudriciones avanzan consumiendo en promedio el 50% de la siembra, este trabajo busca caracterizar el agente causal de la pudrición de bulbo y consolidar esta información como herramienta base para el diseño de protocolos de manejo integrado de la enfermedad.

ABSTRACT

Ornamental species are increasingly an opportunity for economic growth in the regions, San Antonio del Tequendama has become an icon of the ornamental production area cultivated with these species is growing. Violet of the Alps is one of those species is gaining more space in the market, this plant is grown under greenhouse materos plastic 14 cm in diameter, is grown in specialized substrates for 48 weeks before offering them for sale . However Sn this plant occurs in the farm's crops rot Alpes bulb generating plants wilt, these rots advance consuming on average 50% of sowing, this work is to characterize the causative agent of bulb rot and consolidate this information as a basic tool for the design of protocols for integrated management of the disease.

INTRODUCCION

La violeta de los Alpes o ciclamen (*Cyclamen persicum* Mill.), es una especie tuberosa de la familia Primulaceae, nativa de Palestina, Asia Menor e islas en los mares Egeo y Mediterráneo del este (Larson, 1992). Es un cultivo ornamental de maceta apreciado por su follaje y sus numerosas flores, cada una de estas dura cuatro semanas y la planta puede mantenerse en floración durante meses. (Widmer, 1992). Es un cultivo importante en Europa (Grey-Wilson, 1997), Japón (Koshioka y Masayuki, 1998) y EE.UU. (Boodley, 1996).

El vivero finca los Alpes, propiedad de la empresa Plantas y Plantas está ubicado en el municipio de san Antonio del Tequendama y se dedica a la producción en masa de ciclamen, con una trayectoria de 12 años en la siembra de esta planta en macetas de 14 centímetros de diámetro y bajo sustratos especializados, con una siembra mensual de 6000 plántulas. Este cultivo como cualquier otro presenta problemáticas agronómicas en relación a su manejo. Desde hace algún tiempo se han encontrado plantas con pudrición de bulbos y finalmente muerte de las mismas, generando un impacto significativo por la reducción de la producción total en promedio en unas 3000 unidades y esto a su vez genera en la empresa valores de pérdida económica de 12 millones de pesos mensuales. (Comunicación personal empresa plantas y plantas 2015).

METODOLOGIA

UBICACIÓN

Las muestras de material vegetal con síntomas de la enfermedad que se utilizaron para este trabajo se tomaron de la empresa Plantas y Plantas de Colombia S.A.S, el cultivo estaba situado en la finca los Alpes ubicada en el km 14 vía Bogotá- Mesitas, corregimiento de Santandercito del municipio de San Antonio del Tequendama, con una altitud de 1645 m.s.n.m y temperatura media anual oscila entre 19 y 21°C. Estas muestras se transportaron al laboratorio de microbiología y fitopatología de la Universidad de Cundinamarca en Fusagasugá donde se desarrolló toda la metodología de laboratorio pertinente para la identificación hasta género bacteriano del agente causal de la pudrición de bulbo de la violeta de los Alpes

MATERIAL VEGETAL

Para el desarrollo de este trabajo se tomaron plantas de violeta de los Alpes (*C. persicum Mill.*), teniendo en cuenta criterios como la identificación de síntomas de clorosis y manchas negras ascendentes en la parte basal de la arquitectura de la planta. Se seleccionaron 8 muestras dividiéndolas en 4 estados diferentes de avance de la enfermedad y tomando dos muestras por cada estado, esto con el fin de verificar las características de la enfermedad y ver la relación de estos síntomas con un agente patógeno.

ASLAMIENTO DE BACTERIAS A PARTIR DE MATERIAL VEGETAL ENFERMO

Las muestras seleccionadas se llevaron al laboratorio de microbiología y fitopatología de la Universidad de Cundinamarca sede Fusagasugá. Para realizar el aislamiento se tomaron trozos de hojas y bulbos afectados se realiza el corte en la zona de avance del síntoma (entre los tejidos sanos y afectados) generando trozos pequeños los cuales se lavan con agua destilada estéril (ADE) (Agrios 2005). Se tomaron trozos del material afectado los cuales se desinfectaron con hipoclorito de sodio (NaCl) al 2% durante 1 min y posteriormente se lavaron tres veces con ADE, para ubicarlos en tubos de ensayo en solución con ADE esta solución se maceró y se tomó una pequeña porción con micro pipeta, esto con el fin de realizar la diluciones y la posterior siembra por agotamiento mediante estría múltiple en cajas de Petri con agar nutritivo (AN). Las cajas de Petri se incubaron durante 48 horas hasta la aparición de colonias, estas a su vez se repicaron de manera individual en AN después de 24 horas para obtener cultivos puros y realizar pruebas de patogenicidad (Agrios 2005).

IDENTIFICACION DE BACTERIAS FITOPATOGENAS

Géneros comunes de bacterias fitopatógenas y sus principales características bioquímicas (adaptada de Schaad (1988)).

	<i>Erwinia</i>	<i>Pantoea</i>	<i>Acidovorax</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Ralstonia</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Xanthomonas</i>	<i>Xylophilus</i>	<i>Agrobacterium</i>	<i>Clavibacter</i>	<i>Clostridium</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Streptomyces</i>
Gram positivo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+

Crecimiento anaeróbico	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Crecimiento aeróbico	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Colonias amarillas en YDC	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-
Colonias mucoides en YDC a 30 oC.	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-
Pigmentos fluorescentes en KB.	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pigmentos no fluorescentes difusibles al medio de cultivo en KB	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Ureasa	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+
Catalasa	+	+	VR+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Oxidasa	-	-	+	+	+	+	+	+	+				+
Formación de esporas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Presencia de micelio aéreo.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Licuefacción de gelatina	VR+	VR+	VR-	VR+	-	VR+	+	VR+	VR+	+	-	+	
Citrato	+	+	VR+	+	+	+	+		+	-		-	

PRUEBAS DE PATOGENICIDAD

Con el fin de determinar la capacidad de las colonias aisladas se hicieron dos pruebas de patogenicidad. Para observar si se producían pudriciones blandas se utilizaron rodajas de papa (*Solanum tuberosum*) y si causaban enfermedad en hospederos de los cuales fueron aisladas se utilizaron plantas sanas de violeta de los Alpes (*C. persicum* Mill). Para los dos ensayos Se tomaron porciones de colonias bacterianas sembradas con 24 horas de anterioridad y se realizaron diluciones seriadas en base 10 (Transfiriendo 1ml de la primera suspensión a tubos de ensayo con 9 ml agua destilada estéril (ADE)). Seguidamente se realizaron mediciones con un espectrofotómetro Genesys 10S UV – VIS Thermo scientific™, con absorbancias entre 0,08 y 0,1 a a una longitud de onda de 625nm, lo que equivale a una concentración bacteriana aproximada de 1.0×10^8 unidades formadoras de colonia (Perilla et al., 2004).

RESULTADOS

ESTABLECIMIENTO DE LA SINTOMATOLOGÍA DE LA PUDRICIÓN DE BULBO

Como primer síntoma se evidencia la clorosis de las hojas de la base de la planta, estas mismas hojas continúan en un proceso de senescencia el cual se puede evidenciar en la imagen número dos además de la pérdida de la turgencia de peciolo y pedúnculos por igual en toda la planta.

Conkey								
Crecimiento medio YGC (Colonias amarillas)	-	-	-	+	-	-	-	+
Crecimiento en Citrato de Simmons	+	+	+	+	-	+	-	+
Pigmentos fluorescentes en KB	-	-	-	+	-	-	-	+
Oxidasa	-	-	-	+	-	-	+	+
Catalasa	+	+	+	+	+	+	-	+
Ureasa	+	+	+	+	+	+	+	+
Crecimiento aeróbico	+	+	+	+	+	+	+	+
Crecimiento anaeróbico	+	+	+	+	-	+	-	+
Licuefacción de la gelatina	+	+	+	+	+	+	+	+

Dónde: Amarillo= genero Erwinia, Azul rey = pseudomonas, azul agua marina = ralstonia.

RESULTADO DE LAS PRUEBAS DE PATOGENICIDAD

Se obtuvo un inculo bacteriano que se inyectó con jeringa en rodajas de papa sana y sobre plantas sanas de violeta de los Alpes, en rodajas de papa al cabo de 8 días después de la inoculación estas rodajas presentaron síntomas de pudrición blanda, así mismo las plantas sanas de violeta presentaron sus primeros síntomas de infección 8 días después de la inoculación, sin embargo estos síntomas no generan una infección total, es

al cabo de 15 días después de la inoculación que la enfermedad infesta a las plantas sanas llevándolas al colapso y posterior muerte.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

- Se lograron establecer 4 estados claros de la pudrición de bulbo de la violeta de los Alpes (*C. persicum* Mill.), iniciando con una ligera clorosis en la hoja de la planta y la aparición de necrosis en los peciolos, pasando por la pudrición del bulbo, hasta el colapso total de la planta.
- Se aislaron dos tipos de colonias a partir de los bulbos de plantas enfermas de violeta de los Alpes (*C. persicum* Mill.), colonias color crema, levantadas y de borde redondeado.
- 5 de las 8 colonias obtenidas en el laboratorio aisladas a partir de muestras de bulbos de violeta de los Alpes infectados con pudrición, son colonias Gram negativas, oxidasa negativas, ureasa positiva, fermentativas, no hidrolizan gelatina y catalasa positiva.
- Por medio de la siembra en medios selectivos y pruebas bioquímicas se pudo determinar que el agente causal de la pudrición de bulbo en violetas de los Alpes, cultivadas bajo invernadero en san Antonio del Tequendama. Se encuentra asociado a una infección bacteriana de colonias ubicadas del género *Erwinia* en colonias bacterianas de los estados 1, 2 y 3.
- Se encontraron también los géneros *Pseudomonas* y *Ralstonia*.
- Todos los aislamientos inoculados tanto en las rodajas de papa (*S. tuberosum*) como en las plantas sanas de violeta de los Alpes (*C. persicum* Mill.) presentaron síntomas asociados a pudrición bacteriana. En el caso de los géneros diferentes a *Erwinia* se sospecha de una posible asociación de otros agentes fitopatógenos o de una contaminación.
- Por medio de la pruebas de patogenicidad se logró establecer el periodo de incubación de 8 días, a 20°C y 85% de humedad relativa.
- La sintomatología de la enfermedad establecida, es de importancia en momento de generar monitoreo en los cultivos, esta herramienta de monitoreo permite dar un mejor manejo a la incidencia de la enfermedad.

. BIBLIOGRAFÍA

AGRIOS, G. 1986. Fitopatología. Ediciones limusa. Mejico.

BARRET, T. 1975. Preparation of bacterial vaccine in: R.N. Godman (Ed). proceedings of the first workshop of phytobacteriology. University of Missouri press. Columbia. P 73.

BILLING, E 1987. Bacteria as plant pathogens. Van nostrand reinhold Co. Ltd. Berkshire, inglaterra.

BOODLEY, J.W. 1996. The commercial greenhouse. 2da edicion. ed. delmar publishers. New York, 612 p.

FLUHARTY, D. M., AND W. L. PACKARD. 1967. Differentiation of Gram-positive and Gram-negative bacteria without staining. Am. J. Vet. Clin. Pathol. 1:31-35.

FLORES A., R.; LAGUNES T., A. 1998. La Horticultura Ornamental en México. Ed. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática - Colegio de Postgraduados. Aguascalientes, Ags. México. 88 p.

FLORES, A. R; RODRIGUEZ, M.A; MEJIA, J.M. **2009**. Producción de plantas en maceta. Academia de floricultura del departamento de fitotecnia De la universidad autónoma Chapingo, MEXICO. P. 31 -39

GARDAN, L., GOUY, C., CHRISTEN, R., and SAMSON, R. 2003. Elevation of three subspecies of *Pectobacterium carotovorum* to species level: *Pectobacterium atrosepticum* sp. nov., *Pectobacterium betavascularum* sp. nov. and *Pectobacterium wasabiae* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 53:381–391

GAVINI FJ, MERGAERT A, BEJI C, MIELCAREK D, IZARD K, KERSTERS, DE LEY J. Transfer of *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck 1888) Ewing and Fife 1972 to *Pantoea* gen nov. as *Pantoea dispersa* sp. Nov. *Journal Syst. Bacteriol.* 1989. 39: 337-345.

GITAITIS, R., MACDONALD, G., TORRANCE, R., HARTLEY, R., SUMNER, D. R., GAY, J. D., AND JOHNSON, W. C., III. 1998. Bacterial streak and bulb rot of sweet onion: II. Epiphytic survival of *Pseudomonas viridiflava* in association with multiple weed hosts. *Plant Dis.* 82:935-938.

GREY-WILSON, C. 1997. *Cyclamen. A Guide for Gardeners, Horticulturists and Botanists.* Ed. B.T. Batsford Ltd. Londres. 192 p.

GRANADA E, GUTIERREZ B, CASTILLO N. 1996. Identificación de bacterias fitopatógenas universidad nacional de Colombia. Sede Bogotá.

HOLT. J, N.R. KRIEG; P.H. SNEATH, T. STANLEY Y T. WILLIAMS. 1994. *Begey's manual of determinate bacteriology.* Williams and Wilkins. Baltimore, Maryland

JANSE, J. D. 1996. Potato brown rot in Western Europe – History, presence occurrence and some remarks on possible origin, epidemiology and control strategies. *Bull. OEPP/EPPO Bull.* 26:679-985.

KREJZAR V., MERTELÍK J., PÁNKOVÁ I., KLOUDOVÁ K., KŮDELA V. (2008): *Pseudomonas marginalis* associated with soft rot of *Zantedeschia* spp. *Plant. Protect. Sci.*, 44: 85–90.

KUNSTMANN, JUAN PABLO, CIAMPI, LUIGI, BÖHM, LAURA, BARRERA, SYLVIA, & COLLADO, LUIS. (2006). Determinación de Especies de *Erwinia* (grupo carotovora) como Agentes Causales de (Pudrición Blanda) en Cala (*Zantedeschia* spp.). *Agricultura Técnica*, 66(3), 247-255.

KADO, C.I. Y M.G. HASKETT. 1970. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology* 6: 969- 976.

KADO, C.I. 2006. *Erwinia* and related genera. *Prokaryotes.* 6:443–450

KONEMAN EW, ALLEN SD, JANDA WM, SCHRECKENBERGER PC, Winn WC. 1999. "Diagnóstico Microbiológico". 5ª ed. Ed. Médica Panamericana SA. Buenos Aires.

KOSHIOKA, M.; MASAYUKI, A. 1998. World trends and requirements: Japan. Proceedings of the Third International Symposium on New Floricultural Crops, Perth, Western Australia, 1-4 Octubre 1996. Acta Horticulturae No. 454. pp. 19-28.

LARSON. R. A. 1992. Introduction to Floriculture. 2nd Edition. Academic Press, Inc. San Diego, California, USA. 407 p.

LIN, Y. 1980. Use of potassium hydroxide technique for the differentiation of Gram-positive and Gram-negative bacteria. Brew. Dig. 55:36-37.

MOREL, G, MOREL, P. Recuperado de www.cyclamen.com

PERILLA, M., AJELLO, G., BOPP C., ELLIOT, J., FACKLAM, R., KNAPP, J., POPOVIC, T., WELLS, J., DOWELL, S. 2004. Manual de Laboratorio para la Identificación y Prueba de Susceptibilidad a los antimicrobianos de Patógenos Bacterianos de Importancia para la Salud Pública en el Mundo en Desarrollo. Organización mundial de la salud. OMS.

SCHAAD, N.W.(Ed). 1994. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. American phytopathological society, ST. Paul, Minnesota. 148 p.

SCHAAD, N. W. 1988. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. The American Phytopathological Society St. 2a, Edición. Minnesota, USA. 164 p.

SCHAAD, N.W., JONES, J.B., and CHUN, W. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. The American Phytopathological Society Press. St. Paul, Minnesota, USA. 373 p.

SHEVCHIK, V.E., AND HUGOUVIEUX-COTTE-PATTAT, N. 2003. PaeX, a second pectin acetylesterase of *Erwinia chrysanthemi* 3937. Journal of Bacteriology 185:3091-100.

SUSLOW, T.M. SCHORTH Y M.ISAKA. 1982. application of a rapid method for gram differentiation of plant pathogenic and saprofitic acteria without staining phytopathologic. 72: 917-918

WIDMER, R.E.; STUART, M.C.; LYONS, R.E. 1991. Seven month 4" cyclamen
– WIDMER PLAN. PP. 477-480. *In*: Ball RedBook 15° Edición. V. Ball (Ed). Ed. Geo. J. Ball Publishing. Chicago.

YAP, M.N., BARAK, J.D., and CHARKOWSKI, A.O. 2004. Genomic diversity of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and its correlation with virulence. *Applied and Environmental Microbiology* 70:3013–3023.